

去勢および老化雌ラットにおける視床下部 β -エンドルフィンの形態学的研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

富 松 功 光

(平成4年9月18日受付)

更年期障害の代表的愁訴である熱感 (hot flush) の発症機序に密接に関与しているといわれている β -エンドルフィン (β -endorphin, β -EP) について, 卵巣摘除および老化に伴う変化とエストロゲン投与による影響を雌ラットで検討した。40日齢 (M 群), 40日齢に両側卵巣摘除 (去勢) した54日齢 (OVX 群), 去勢し54日齢より安息香酸エストラジオール (estradiol benzoate, EB) 0.1mg を連日7日間皮下投与した60日齢 (OVX+e 群), 去勢し54日齢に EB1mg 1回皮下投与した60日齢 (OVX+E 群), 500日齢 (old 群), 500日齢より EB 0.1mg を連日7日間皮下投与した506日齢 (old+e 群), 500日齢に EB 1mg 1回皮下投与した506日齢 (old+E 群) の雌ラット7群の視床下部について, β -EP の免疫組織染色を行い, 光学および電子顕微鏡で観察した。OVX 群では, 弓状核 (arcuate nuclei, ARN) の β -EP 陽性細胞はほとんどみられず, 正中隆起部の神経核 (nuclei of median eminence, ME) では, M 群と比較して, β -EP 陽性細胞は減少していた。正中隆起部神経線維 (nerve fibers of median eminence, me) では, M 群と比較して, β -EP 陽性神経線維の染色性は低下していた。また, 正中隆起部の神経細胞線維数 (以下, 神経線維数) は, M 群と比較して有意に減少していた ($p<0.05$)。OVX+e 群では, ARN の β -EP 陽性細胞の数および染色性共にやや回復していた。ME では, M 群とほぼ同じ程度に回復し, me では, M 群よりも染色性が増加していた。神経線維数はやや回復し, EB 投与により神経膠細胞数は有意に増加した ($p<0.05$)。OVX+E 群では, ARN の β -EP 陽性細胞の数および染色性共に M 群とほぼ同じ程度に回復していた。ME では, M 群とほぼ同じ程度に回復し, me では, M 群よりも染色性が増加していた。神経線維数は, OVX, OVX+e の両群に比して有意に増加し ($p<0.05$), 神経膠細胞数の増加は特に EB 1回投与大量群でより著明であった ($p<0.05$)。old 群では, ARN の β -EP 陽性細胞はほとんどみられず, ME では, M 群と比較して β -EP 陽性細胞は減少し, me では M 群とほぼ同程度であった。神経線維数は, M 群と比較して, 有意に減少していた ($p<0.05$)。また, ARN における神経細胞内巨大ミトコンドリアの割合は, old 群では約7%であり, M 群の約2%に比し著明に増加していた ($p<0.05$)。old+e および old+E 群では, ARN, ME および me いずれの部位でも β -EP の回復はみられず, 神経線維数の増加も認められなかった。old 群の ARN における神経細胞内巨大ミトコンドリアの割合は, EB の投与により減少し, 特に old+E 群で著明であった ($p<0.05$)。以上, エストロゲンの投与によって卵巣摘除ラットの視床下部 β -EP 陽性細胞数および染色性, 神経線維数が回復し, 神経膠細胞数は増加したが, その程度は投与法により異なっていた。老ラットではこれらの回復はみられなかった。また, 視床下部の神経細胞内の形態学的観察から, エストロゲンが老化の予防になんらかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

Key words β -endorphin, estrogen, oophorectomy, hypothalamus, rat

わが国における平均余命の延長に伴う老人人口の増加は著しく, 中高年者の健康管理が重要な課題となってきた。産科婦人科領域においても, 更年期・閉経後女性にみられる諸疾患が閉経周辺期にみられる内分泌変動, とくにエストロゲン (estrogen) の低下と密接に関連していること, 近年その力点が中高年女性に向けられ, これに対するホルモン療法が注目をあびている。

中高年女性の老化過程において, 身体的に自覚される最も明瞭な老化現象は閉経である。この閉経前後の時期は更年期とされ, 性成熟期から老年期への移行に伴う卵巣機能の衰退によって, 月経異常や自律神経失調症状, 精神神経症状を主体とした

いわゆる更年期障害がよく認められる。また, 閉経後の老年期にみられる骨粗鬆症, 動脈硬化症などの骨・脂質代謝異常や, 老人性陰炎などの性器の萎縮性疾患も更年期に現れはじめ, 閉経後数年の進行とともに次第に多くなってくる。それらの発症機序については未だ不明の点も多いが, 女性の老化過程に伴う疾患の発症には, 閉経を境にして急減するエストロゲンが密接に関連している。したがって, これら疾患の予防・治療のために, 閉経周辺期以降の女性を対象としてエストロゲン補充療法を行うことが必要であると, 近年とくに強調されてきている。

更年期障害症状は, 閉経前後のみならず両側卵巣摘除手術後にもよく認められるが, その病態生理ならびに病因も未だ完全

Abbreviations: ARN, arcuate nuclei; BBB, blood brain barrier; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; β -EP, β -endorphin; DA, dopamine; EB, estradiol benzoate; FE2, free estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; Gn-RH, gonadotropin-releasing hormone; LH, luteinizing hormone; LH-RH, luteinizing hormone-releasing

に解明されていない。更年期障害の代表的愁訴である熱感（ほてり, hot flush）や精神症状の発現には、エストロゲンの低下とともに視床下部またはその上位レベルにおける活性アミンや神経ペプチドなどのいわゆる神経伝達物質・神経調節因子の変化が密接に関与していることが示唆されている。しかし、更年期障害の症状は多種多彩であり、個人を取り巻く環境や性格・気質にも関連しているために¹⁾、適当な実験動物や実験条件が確立しておらず、その基礎的な研究への取り組みも十分とは言えなかった。しかし、最近では熱感の発症機序に β -エンドルフィン (β -endorphin, β -EP) が深く関与していることが報告されており²⁾、脳内の形態学的研究の進歩と相俟って^{3,4)}、更年期障害の発症機序における視床下部のオピオイド分泌性神経細胞（オピオイドニューロン, opioid neuron）の役割が注目されている。

本研究では、エストロゲンと β -EP の関係を考究するために、雌ラットを用い、視床下部のニューロンの卵巣摘除および老化に伴う変化と、エストロゲンの投与による影響を形態学的に検討した。

材料および方法

1. 実験動物

実験にはウイスター (Wistar) 系ラット (日本チャールズ・リバー, 厚木) を使用した。飼育条件は、明時間11.5時間 (8時30分～20時)、暗時間12.5時間、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とし、飼料CRF-1 (日本チャールズ・リバー) および飲料水は自由摂取とした。

2. 試薬

実験に使用した試薬は以下の通りである。

エチルエーテル、エタノール、グリセリン、ショ糖、過酸化水素、グルタルアルデヒド、ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide)、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛は、和光純薬工業 (大阪) より購入し、蒸留水にて希釈後適宜の濃度溶液として使用した。パラホルムアルデヒド (Sigma, St. Louis, U.S.A.), OCT コンパウンド (Miles Scientific, Naperville, U.S.A.), 4 酸化オスミウム (osmium tetroxide; MERCK, Darmstadt, Germany), 4 塩酸 3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine 4HCl, 同仁化学, 熊本) およびエボン812 (応研商事, 東京) は、それぞれを購入して実験に供した。

安息香酸エストラジオール (estradiol benzoate, EB) (帝國臓器, 東京) は、ゴマ油 (半井化学薬品, 京都) で溶解して使用した。リン酸緩衝液 (phosphate buffer solution, PBS) は、リン酸 1 カリウム (KH_2PO_4 , 和光純薬工業) 0.032mol とリン酸水素 2 カリウム (K_2HPO_4 , 和光純薬工業) 0.168mol を蒸留水 1000ml に溶解, pH 7.4 に調整したものを用いた。ヘパリン (heparin, 小玉, 東京) は、PBS にて希釈し、 20単位/ml の溶液として使用した。

ヤギ血清 (goat normal serum) およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (peroxidase labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G) は、Bio Genex Laboratories (Dublin, Ireland) より購入した。ウサギ抗ヒト β -EP 抗体は、Bioproducts (Lot. No. i4 56-002, Rhostyllen-Wrexham, U.K.) より

購入した。なお、今回使用した β -EP 抗体は、 α -エンドルフィン (α -endorphin) との間にわずかな交差反応 ($73.5 \sim 84.4:1$) を認めたが、他のエンドルフィンやエンケファリン (enkephalin) との交差反応は認めなかった。

3. 検体採取と方法

以下の 7 実験群 (各群, $n=5$) の雌ラットから検体を採取した。第 1 群, 40 日齢雌ラット (mature, M 群); 第 2 群, 40 日齢に両側卵巣摘除した 54 日齢雌ラット (OVX 群); 第 3 群, 40 日齢に両側卵巣摘除し、54 日齢より EB 0.1mg を連日 7 日間皮下投与した 60 日齢雌ラット (OVX+e 群); 第 4 群, 40 日齢に両側卵巣摘除し、54 日齢より EB 1mg を皮下投与した 60 日齢雌ラット (OVX+E 群); 第 5 群, 500 日齢老雌ラット (old 群); 第 6 群, 500 日齢より EB 0.1mg を連日 7 日間皮下投与した 506 日齢雌ラット (old+e 群); 第 7 群, 500 日齢に EB 1mg を皮下投与した 506 日齢雌ラット (old+E 群)。

まず、エーテル麻酔のもとに、各群ラットの上行大動脈に留置針を留置し、横隔膜下にて下行大動脈を結紮した。留置針よりヘパリン含有 PBS を 12ml を注入し、次いで固定液 (4% パラホルムアルデヒド) を 30ml/分 の速度で 15 分間注入した。その後、脳全体を取り出し、Groot の図表⁵⁾に基づいて視床下部を摘出した。

摘出材料を、まず 10% ショ糖 PBS にて 4°C 、4 時間洗浄した。次いで、20% ショ糖 PBS, 20% ショ糖 PBS + 5% グリセリン PBS で、順次 4°C 、4 時間の洗浄を行った。洗浄後、エタノール・ドライアイスにて冷却した OCT コンパウンドに包埋した。凍結切片作成機 (Cryostat, BRIGHT, Huntington, U.K.) にて凍結組織標本を薄切し、 $6\text{--}12\mu\text{m}$ の厚さの切片を採取した。凍結切片を、卵白アルブミン処理スライドガラス上に載せ、室温にて 30 分間乾燥した。更に PBS にて 4°C 、5 分間の洗浄を 3 回行った。

4. 免疫組織染色

免疫組織染色法としてはペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法 (peroxidase-antiperoxidase method, PAP 法) を用い、以下の方法で行ってそれぞれの観察に供した。まず、組織標本における非特異的染色を防ぐために、事前に 1% ヤギ血清で 20 分間インキュベーションし、 4°C の PBS にて洗浄した。組織切片にウサギ抗ヒト β -EP 抗体 ($1:2,000$ に希釈) を滴下し、 4°C にて 72 時間インキュベーションした。次いで、 4°C の PBS で洗浄したのち 10 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G を滴下し、30 分間インキュベーションした。その後、 4°C の PBS にて洗浄した。光学顕微鏡観察用の染色は、0.01% 過酸化水素含有 0.05% 4 塩酸 3, 3'-ジアミノベンチジン溶液 (完全 Graham-Karnovsky 溶液, complete Graham-Karnovsky solution) 内での 4°C 、10 分間、ペルオキシダーゼ反応に行なった。更に、ヘマトキシリン核染色を行い、観察に供した。

電子顕微鏡用のものは、まず、 4°C の PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行い、1% グルタルアルデヒドで 4°C 、20 分間固定した。固定後、更に 4°C の PBS で洗浄し、1% ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) 含有 0.05% 4 塩酸 3, 3'-ジアミノベンチジン溶液 (不完全 Graham-Karnovsky 溶

hormone; ME, nuclei of median eminence; me, nerve fibers of median eminence; PBS, phosphate buffer solution; PRL, prolactin; SHBG, sex-hormone binding globulin

液, incomplete Graham-Karnovsky solution) 内で室温, 30 分間, ペルオキシダーゼ反応を行った。更に, 0.01% 過酸化水素含有 0.05% 4 塩酸 3, 3'-ジアミノベンチジン溶液 (完全 Graham-Karnovsky 溶液) 内で, 4℃, 5 分間インキュベーションを行い, 4℃の PBS にて洗浄した。標本を, 2% 4 酸化オスミウムにて室温で 1 時間固定し, エタノールで脱水した後, エポン 812 にて包埋した。包埋標本をウルトラミクロトームで薄切し, その切片をシートメッシュに載せたのち, 切片を酢酸ウラニールとクエン酸鉛で染色し, 観察に供した。

これらの標本より, 視床下部弓状核と正中隆起部の β -EP 局在について神経細胞内陽性顆粒の数および染色強度と神経線維の染色強度を (−, ±, +, ++) の 4 段階に分けて検討した。

V. 視床下部弓状核および正中隆起部の組織学的検討

通常の電顕所見から正中隆起部の神経線維数と神経膠細胞数

を計測し, それぞれの正中隆起部の単位面積当たりの神経細胞線維数および神経膠細胞数として各群間で比較検討した。

弓状核の神経細胞を無作為に 30 個抽出し, 神経細胞内の巨大ミトコンドリア (直径 1 μ m 以上) の割合を各群間で比較検討した。

VI. 統計学的検討

実験結果の統計学的処理は, Student t-検定にて行った。

成 績

I. ラット視床下部における β -EP の分布

ラット視床下部における β -EP の分布については, 第 3 脳室外側の弓状核 (arcuate nuclei, ARN) と下垂体門脈直上の正中隆起部の神経核 (nuclei of median eminence, ME), および正中隆起部の神経線維 (nerve fibers of median eminence, me) に分けて, それぞれ検討した (図 1, 2)。

1. 弓状核

成熟雌ラット (M 群) と比較して, 卵巣摘除 14 日後 (OVX 群) では β -EP 陽性細胞はほとんどみられなかった (図 3, 4)。また, 500 日齢老ラット (old 群) では, 非特異的陽性部分が散在するのみで, β -EP 陽性細胞はほとんどみられなかった (図 5)。しかし, 電子顕微鏡所見では, 細胞体内の所々に β -EP 陽性顆粒が認められた (図 6)。卵巣摘除後 EB 0.1mg を連日 7 日間皮下投与したラット (OVX+e 群) では, β -EP 陽性細胞の数およ

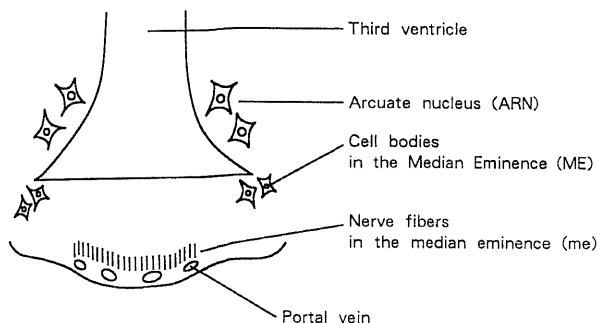


Fig. 1. Schematic illustration of the rat hypothalamus.

| | ARN | ME | me |
|---------|-----|----|----|
| Mature | | | |
| OVX | | | |
| OVX + e | | | |
| OVX + E | | | |
| old | | | |
| old + e | | | |
| old + E | | | |

□, (−); □, (±); ■, (+); ▨, (++)

Fig. 2. β -EP distribution in the hypothalamus.

β -EP-positive cells were rarely seen in the arcuate nucleus (ARN) in the ovariectomized (OVX) and the old groups (old). β -EP positive cells in the median eminence (ME) were decreased in the OVX and old groups. β -EP containing nerve fibers in the median eminence (me) were not decreased in the old group, but were decreased in the OVX group. Administration of 0.1mg estradiol benzoate (EB) per day for 7 days in the OVX group (OVX+e) led to a minor recovery of β -EP in the ARN, and led to the same staining as that in mature female rats (M) in the cell bodies of the ME, and more intense staining than that in mature rats in the nerve fibers. The administration of 1mg EB brought about recovery in the OVX group to the level in mature female rats in all areas (OVX+E), but in the old group (old+e, E), there was no recovery despite administration of EB.

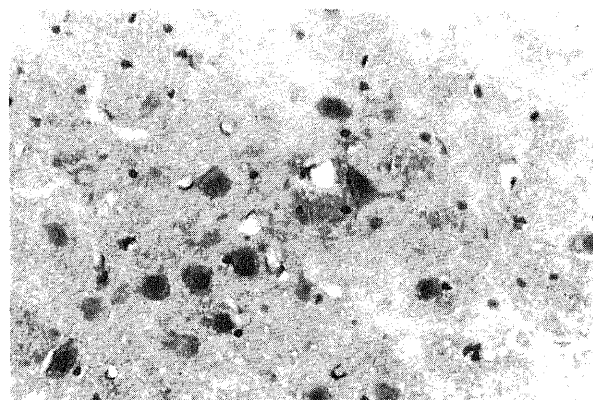


Fig. 3. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of a mature female rat. $\times 20$.

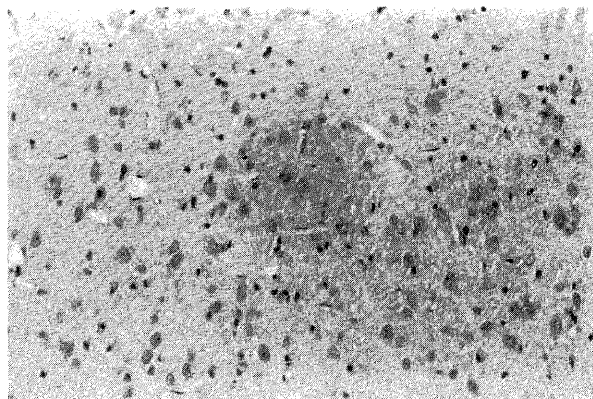


Fig. 4. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of an ovariectomized rat. β -EP-positive cells were rarely seen. $\times 10$.

び染色性共にやや回復していた(図7)。卵巣摘除後 EB 1mg 1 回投与後7日目のラット(OVX+E 群)では、ほぼ成熟雌ラットの状態に回復していた(図8)。しかし、老ラットでは、EB の

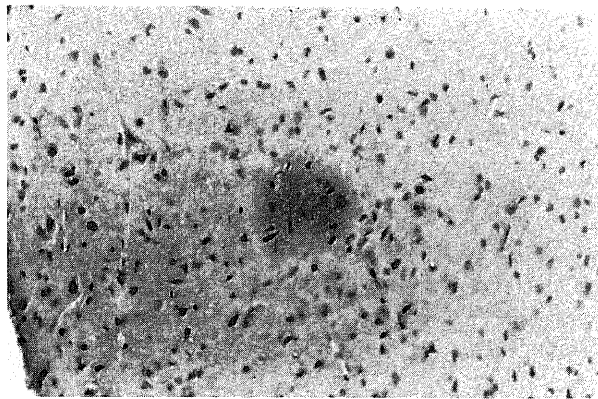


Fig. 5. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of a 500-day-old rat. β -EP-positive cells were rarely identified, but nonspecific staining was observed. $\times 10$.

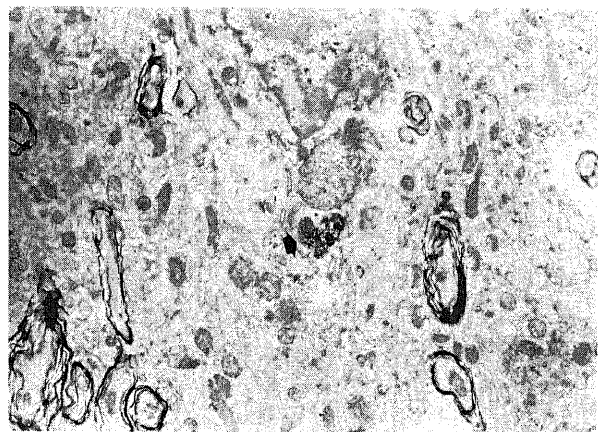


Fig. 6. Electron micrograph of immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of a 500 day-old rat. β -EP positive granules (arrow) could be seen adjacent to the giant mitochondria in the neuron. $\times 6,000$.

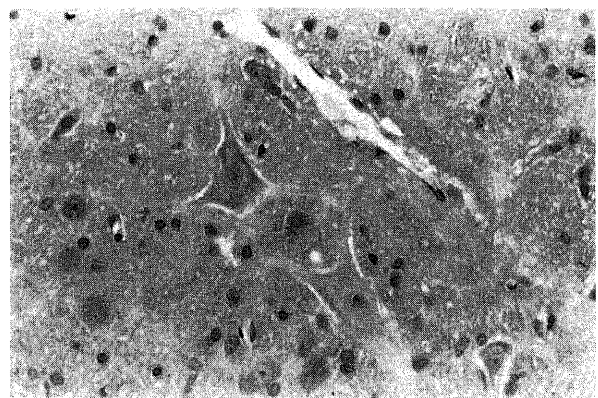


Fig. 7. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of a rat which received 0.1mg EB per day for 7 days after ovariectomy (OVX+e). β -EP-positive cells were increased in number. $\times 20$.

投与方法に関係なく β -EP 陽性細胞の回復は認められなかった。

2. 正中隆起部神経核

M群と比較して、OVX 群、old 群とも β -EP 陽性細胞は減少していた(図9, 10)。OVX+e, OVX+E の両群では、ほぼ M 群と同じ程度に回復していた(図11)。しかし、old+e 群および old+E 群においては、 β -EP 陽性細胞の回復は認められなかった。

3. 正中隆起部神経線維

M 群と比較して、OVX 群では β -EP 陽性神経線維の染色性は低下していたが、old 群では M 群とほぼ同程度であった(図9, 10)。OVX+e 群、OVX+E 群では、ともに M 群よりも染色性が増加していた(図11)。しかし、old+e, old+E の両群に

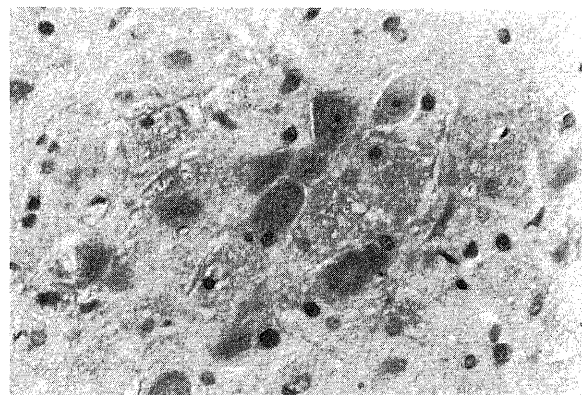


Fig. 8. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells in the arcuate nucleus of a rat which received one dose of 1mg EB after ovariectomy (OVX+E). β -EP-positive cells were increased in number to the levels those were seen in mature female rats. $\times 20$.

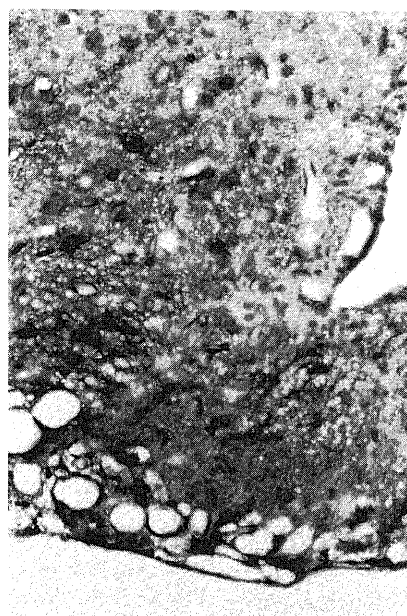


Fig. 9. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells and nerve fibers in the median eminence of a mature female rat (M). $\times 10$.

おいては、M 群との間に差を認めなかった。

Ⅱ. 正中隆起部の神経線維数

正中隆起部の神経線維数 (本/ $10^4 \mu\text{m}^2$, 平均 \pm 標準偏差, 以下 mean \pm SD) は、M 群で 98.5 ± 6.2 であったが、OVX 群で 62.3 ± 5.8 , old 群で 75.4 ± 5.2 と、ともに M 群に比し有意に減少していた ($p < 0.05$)。OVX+e 群では 73.5 ± 2.8 とやや回復し、OVX+E 群では 85.6 ± 6.6 と、OVX, OVX+e の両群に比して有意に増加していた ($p < 0.05$)。しかし、old+e 群では $68.2 \pm$

3 \pm 5.8, old 群で 75.4 ± 5.2 と、ともに M 群に比し有意に減少していた ($p < 0.05$)。OVX+e 群では 73.5 ± 2.8 とやや回復し、OVX+E 群では 85.6 ± 6.6 と、OVX, OVX+e の両群に比して有意に増加していた ($p < 0.05$)。しかし、old+e 群では $68.2 \pm$

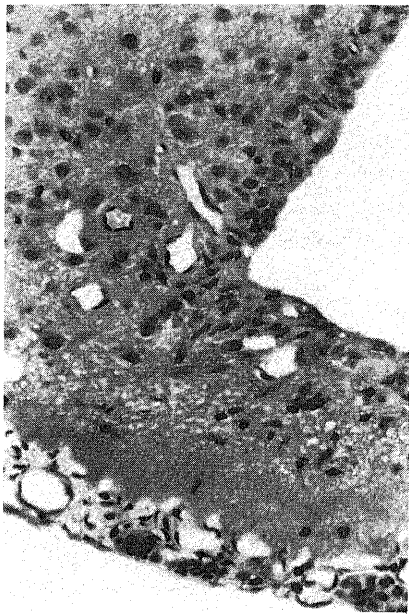


Fig. 10. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells and nerve fibers in the median eminence of a ovariectomized rat (OVX). The number of β -EP-positive cells in the median eminence and staining of β -EP neuron fibers were decreased. $\times 10$.



Fig. 11. Immunoperoxidase staining of β -EP-positive cells (small arrow) and nerve fibers in the median eminence of a rat which received one dose of 1mg EB after ovariectomy (OVX+E). β -EP positive nerve fibers (large arrow) increased in number to the level of those in mature female rats. $\times 10$.

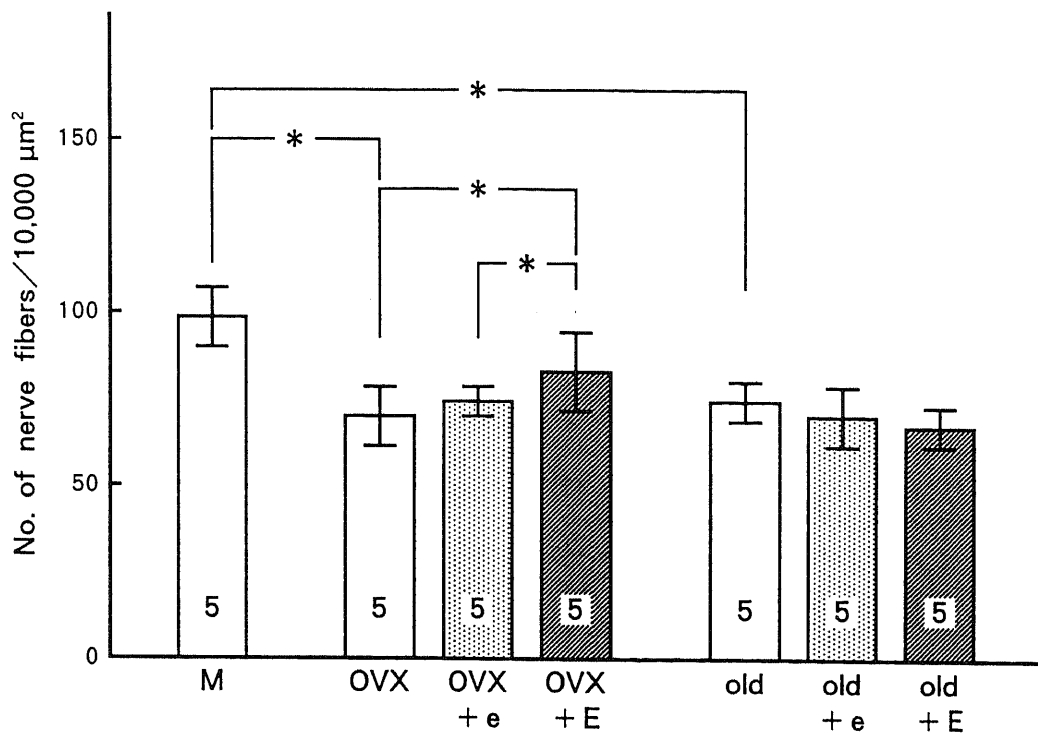


Fig. 12. Number of nerve fibers in the median eminence. Numbers in both the OVX and the old group were less than those in mature female rats. However, in cases of EB administration, significant recovery was seen in the OVX, but not in the old group. Numbers in parentheses indicate the number of examined rats. *, < 0.05 compared with each other.

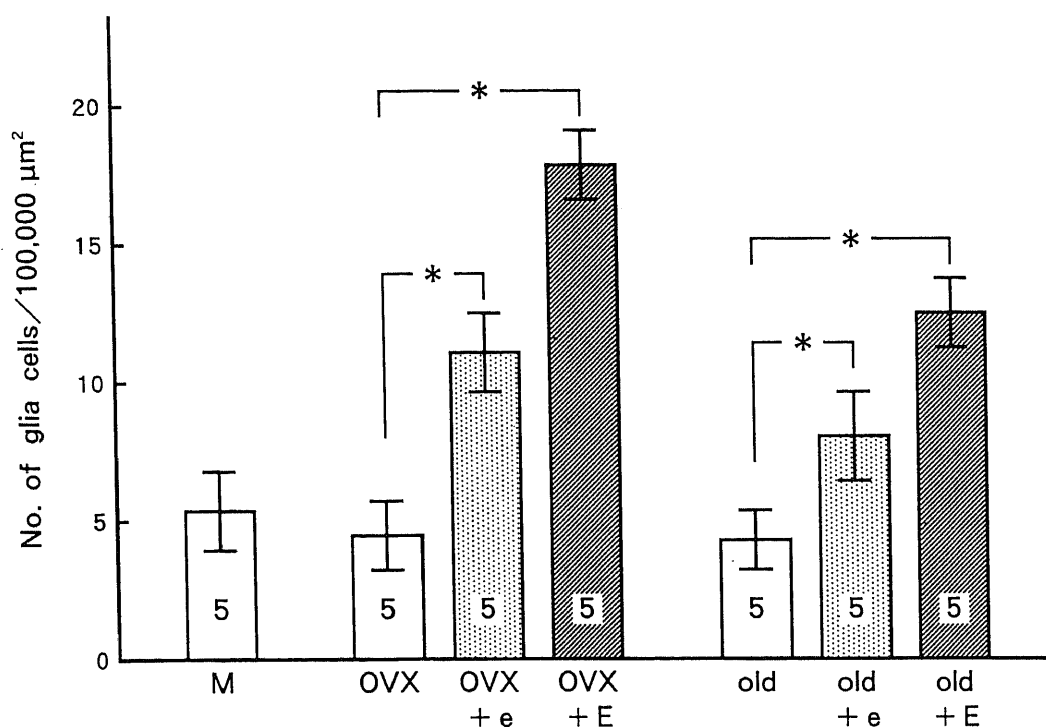


Fig. 13. Number of glial cells in the median eminence. EB administration caused an increase in glial cells, but there was no significant difference between the OVX groups and the old groups. Numbers in parentheses indicate the number of examined rats. *, $p < 0.05$ compared with each other.

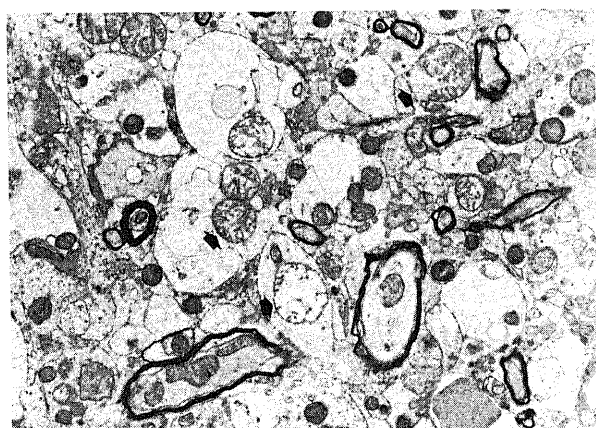


Fig. 14. Giant mitochondria (arrow) in a nerve cell in the arcuate nucleus in the hypothalamus of a 500-day-old rat. $\times 12,000$.

6.3, old+E 群で 66.2 ± 4.9 と, old 群においては EB の投与法に関係なく神経線維数の回復はみられなかった (図12).

Ⅲ. 正中隆起部の神経膠細胞数

正中隆起部の神経膠細胞数 (個/ $10^5 \mu m^2$, mean \pm SD) は, M 群で 5.8 ± 1.5 , OVX 群で 4.8 ± 1.3 , old 群で 3.8 ± 1.9 であり, 各群の間に差は認められなかった. しかし, OVX+e 群では 11.2 ± 2.1 , OVX+E 群では 18.5 ± 1.7 , old+e 群では 7.9 ± 2.0 , old+E 群では 12.9 ± 1.9 と, EB 投与により神経膠細胞数は増加し ($p < 0.05$), 特に EB 1 回大量投与群でより著明であった (図13).

Ⅳ. 視床下部弓状核の神経細胞内巨大ミトコンドリアの割合

視床下部弓状核の神経細胞内における巨大ミトコンドリア (図14) の割合 (% , mean \pm SD) は, M 群 2.38 ± 0.45 と比較して, OVX 群では 3.31 ± 0.82 と変化を認めなかったが, old 群では 7.43 ± 1.20 と著明に増加していた ($p < 0.05$). EB の投与を行うと, OVX+e 群では 3.25 ± 0.80 , OVX+E 群では 3.82 ± 1.20 と, OVX 群についてはほとんど変化を認めなかったが, old 群においては, old+e 群では 5.23 ± 0.71 , old+E 群では 3.56 ± 0.35 と巨大ミトコンドリアの割合は減少し, その減少程度は EB 1 回大量投与群でより著明であった ($p < 0.05$) (図15).

考 察

女性においては, 40歳頃より性腺機能の衰退が次第に顕著となり, 月経不順, 排卵障害, 閉経といった一連の変化が認められる. この時期にみられる最も著明な内分泌環境の変化は, 卵巣からのエストロゲン分泌の減少と性腺刺激ホルモン (ゴナドトロピン, gonadotropins) の分泌亢進である. また, この時期には熱感をはじめとする所謂更年期障害がよく認められる. 更年期障害諸症状と血中・尿中ホルモン値との関係については多数報告されているが, その代表的症状である熱感の程度 (強さ) は, 血中黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH), 卵巣刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) と正の相関, エストラジオール, エストロン, プログステロン, アンドロステンジオン, テストステロンなどと負の相関を示すと当教室の赤祖父らが報告している⁹⁾. しかしながら, 更年期障害の発症機序については, エストロゲンの欠乏が主要因とされているものの, 症状の発現に至るまでの詳細な機構については未だ不明な点が多い.

まず, 血中エストロゲン濃度と更年期障害の症状の程度との

関連性についてであるが、Erlick ら⁷⁾は、性ホルモン結合グロブリン (sex-hormone binding globulin, SHBG) に結合していない血中の遊離エストラジオール (free estradiol, FE₂) と脳内に取り込まれた E₂ との間に相関を見だし、末梢血中エストロゲン濃度と更年期障害の症状の程度との間にも相関の認められることを報告している。また、Pardridge ら⁸⁾も FE₂ の一部が脳内に取り込まれることを証明している。このように、E₂ は、脳血液関門 (blood brain barrier, BBB) を通過し、神経細胞に直接作用して種々の神経細胞の機能に影響を及ぼすものと考えられる。一方、正常成熟雌ラットに対する持続的 E₂ 投与によって、視床下部正中隆起部のドーパミン (dopamine, DA) の減少と血中プロラクチン (prolactin, PRL) の上昇がみられ、視床下部の弓状核神経細胞に変性が認められると報告されているが^{9,10)}、これらのことは E₂ そのものの神経毒的な作用と PRL との相加作用に起因するものと考えられている。

また、視床下部のオピオイドニューロンが、近接した DA ニューロンや性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, Gn-RH) ニューロンと相互に密接に関連していることはよく知られている。すなわち、DA ニューロンはステロイド環境の変動によって Gn-RH ニューロンを抑制あるいは刺激する一方で、ノルアドレナリンニューロンの活性化は Gn-RH の分泌を刺激するが、これらのカテコールアミンの機能を β -EP が調節しているものとみなされている。更年期は、卵巣の老化によってエストロゲン、プロゲステロンなどの性ステロイドが急減する時期である。この時期によくみられる熱感の発現と β -EP および LH との関連についてであるが、Genazzani ら²⁾ および Casper ら¹¹⁾ は、熱感の発作時には LH の

みならず黄体刺激ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone, LH-RH)、 β -EP、 β -リポトロピンなどの拍動性分泌が同調して認められると報告している。教室の研究においても、血中 LH-RH、 β -EP および副腎皮質ホルモン放出ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 値に成熟期・更年期を通じて年齢の進行に伴う有意の変動はみられないが、更年期障害患者の熱感自覚時において、血中 β -EP および ACTH が高値を示すことを認めている^{12,13)}。また、オピオイドの投与は熱感を誘発し¹⁴⁾、他方、熱感・発汗のある更年期女性に対するナロキソン (naloxone) の投与によって症状の改善と血中 LH の低下がみられると報告されている¹⁵⁾。これらのことから、詳細な機構はなお不詳であるが、閉経期あるいは両側卵巣摘除後の急激なエストロゲンの低下が、中枢におけるオピオイドやノルアドレナリンの分泌機構に影響して、LH-RH、LH の拍動性分泌と同時に体温中枢を刺激して熱感を起こすものと考えられる。なお、熱感の発現とこれに同調する LH の拍動性分泌がエストロゲン低下状態のある期間に限定してみられることから、LH 分泌に対する内因性 β -EP の作用は、エストロゲンの消退速度とその多寡によって異なるものと推察される。また臨床上、エストロゲンの補充療法が、更年期障害や卵巣欠落症患者の熱感に対して有効なことは広く認められていること¹⁶⁾であり、近年アルツハイマー型痴呆患者にエストロゲンを投与して、精神・心理テストに改善がみられたとの報告もなされている¹⁷⁾。

一方、視床下部 β -EP と内分泌変動に関する動物実験では、ラット視床下部の β -EP が、性周期¹⁸⁻²⁰⁾、妊娠²¹⁾、高 PRL 血症²²⁾ などの場合に変動すると報告されている。すなわち、性周

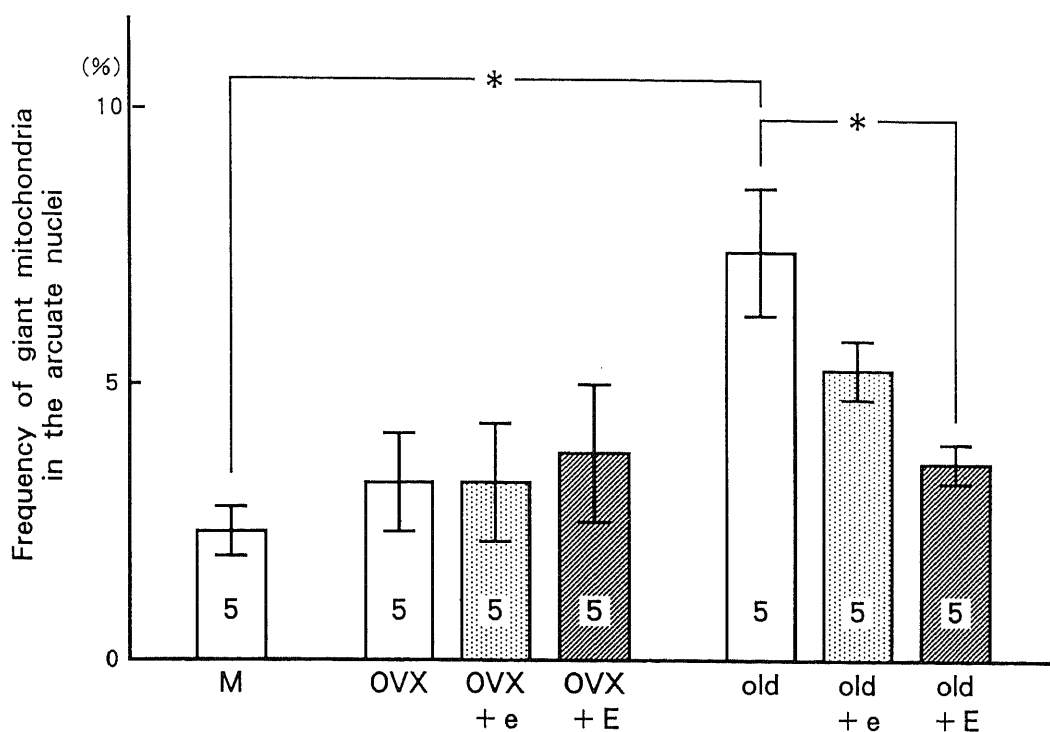


Fig. 15. Frequency of giant mitochondria more than $1\mu\text{m}$ in diameter in the arcuate nucleus. In the OVX groups and the old groups, there were more giant mitochondria, over $1\mu\text{m}$ in diameter than those seen in mature group. There were no decrease of giant mitochondria with EB administration in the OVX group. But in the old group, EB administration, especially 1mg , decreased the frequency of giant mitochondria. Numbers in parentheses indicate the number of examined rats. *, <0.05 compared with each other.

期における発情前期では、弓状核の β -EP が増加する一方、正中隆起部では減少するといった逆の変化がみられる。妊娠の影響については、妊娠 6 から 18 日齢の視床下部（視索前野）内 β -EP は非妊時と比較して有意に増加するが、18 から 22 日齢では有意の減少が認められる。また、DA 受容体の拮抗物質で血中 PRL を上昇させるスルピリドの単回投与では、弓状核や正中隆起部の β -EP が減少し、頻回投与では逆に増加すると報告されている。更に、卵巢摘除雌ラットの脳内に β -EP を投与すると、血中 LH の低下と血中 PRL の上昇が認められると報告されている^{23,24}。

本研究では、更年期女性の熱感の発現に密接に関与しているエストロゲンと β -EP の関連を考究することを主目的として、James ら²⁵の免疫組織学的手法を用い、雌ラットにおける視床下部オピオイドニューロンの卵巢摘除および老化に伴う変化と、エストロゲン投与による影響を形態学的に検索した。

まず、実験材料と方法についてであるが、今回使用したウイスター系雌ラットは、40 日齢ではすでに陰開口を生じた後であり、50 日齢以降になると 3～4 日の性周期を有しており、丁度正常性周期を有するヒト女性における成熟期初期に相当する。卵巢摘除を行った場合、卵巢ホルモンの影響が完全に消失するまで 2 週間かかるので²⁶、今回の実験では、まず 40 日齢で卵巢摘除を行い、術後 14 日目からエストロゲンの投与を開始した。また、通常雌ラットにおいては、約 200 から 300 日齢になると性周期が消失し持続的発情状態（constant estrus）となる²⁷が、今回は 500 日齢の老雌ラットを使用した。 β -EP の形態学的検討については、従来は主として β -EP 抗体を使用した蛍光抗体法が用いられていたが²⁸、蛍光発光が消失するまでの短期間に観察を行わなければならないといった短所があった。本研究で用いたペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法は、反応の安定性や再現性に優れており、方法も比較的簡便であるなどの利点がある。しかし、各種抗体や反応させる組織や動物種などによって、固定法、反応時間、抗体の希釈倍率などが異なり、特に脳内の微量な物質については難しいとされている。そこで、これらの欠点を除去するために、今回、組織の灌流、固定といった実験条件については Lamberts ら²⁹の方法に準じて行い、満足すべき結果を得た。また、エストロゲンの投与については、EB の少量持続投与と 1 回大量投与を行い、その影響の差異について検討した。なお、今回、同一切片で、神経線維レベルの β -EP について光学顕微鏡と電子顕微鏡で同時に観察したが、このような報告はみられず、後述のごとく老ラットの場合に光学顕微鏡では β -EP 陽性細胞がほぼ消失していたが、電子顕微鏡レベルでは神経細胞体内に顆粒として捕らえることができた。この点から、中枢 β -EP 含量は老化とともに減少するが、ニューロンからの産生能はかなり高齢に至るまで持続しているものと推察された。

老化あるいは卵巢摘除後状態下における β -EP とエストロゲンとの関係についてであるが、まず卵巢摘除によって視床下部の β -EP と神経線維数の減少することが認められた。Brawer ら^{30,31}は、60 日齢ウイスター系成熟雌ラットに吉草酸エストラジオール 2mg を単回投与したところ、視床下部の神経細胞内神経伝達物質顆粒と神経線維数が増加し、卵巢摘除によって神経細胞内伝達物質顆粒と神経線維数の減少がみられたと報告しているが、今回の結果はこれと一致するものであった。また、卵巢摘除ラットでは、EB の少量持続、1 回の大量両投与群に

おいて、視床下部内の β -EP の回復と、神経線維数および神経膠細胞数の増加することが認められた。長期にわたるエストロゲンとプロゲステロンの補充により視床下部 β -EP の回復することは Ronald ら³²によって報告されているが、 β -EP の回復にはエストロゲンよりもプロゲステロンが重要であるとしており、今回のような極めて短期間のエストロゲン単独投与によっても β -EP の回復が認められたとの報告は未だみられないようである。しかも、EB の投与方法によって β -EP の分布や反応性が異なり、神経線維数や神経膠細胞数の増加程度も異なっていたが、これらのことは注目すべき所見と思われた。なお、今回の実験では血中ホルモン値の同時測定を行わなかったが、 β -EP と PRL の関連については、Nohtomi ら²³が高プロラクチン血症を生じさせるスルピリドを雌ラットに頻回投与すると、視床下部 β -EP が増加すると報告している。また、LH との関連については、Kalra ら¹⁹の報告によると、去勢後、雄ではテストステロン、雌ではエストロゲンとプロゲステロンといった性ステロイドホルモンを投与した時には、去勢のみ行った時と比較して血中 LH が低下するが、視床下部正中隆起組織内に含まれる β -EP は LH-RH とともに増加し、これはノルアドレナリンの神経分泌経路を介することによるものとしている。今回の研究成績は、Genazzani ら³³⁻³⁵の SD 系ラットの視床下部 β -EP 量が卵巢摘除 3 週間後で有意に減少し、EB 1 日 0.4mg の 21 日間投与によって回復したとする報告と一致するものであるが、エストロゲン投与による β -EP の回復には、その投与によって起こる PRL の上昇と LH の抑制の関与の問題についても重視すべきものと考えられた。

一方、老ラットの視床下部 β -EP は、卵巢摘除ラットと同様に減少していたが、その分布状態が多少異なり、EB の少量持続投与、1 回大量投与のいずれの投与方法によっても回復はみられなかった。また、EB 投与により神経膠細胞数の増加は認められるものの、神経線維数の回復は認められなかった。Cotman ら³⁶は、各種動物において、加齢に伴って脳内神経細胞における神経突起の萎縮と神経接合部の消失が認められることを報告している。 β -EP に関しても、Gambert ら³⁷は、老ラットにおいて β -EP が下垂体では増加しているものの、視床下部では低下していることを報告している。今回の研究では、老ラットの場合、光学顕微鏡の観察において視床下部 β -EP 陽性細胞はほとんど消失していたが、電子顕微鏡の観察において神経細胞内の顆粒として認めることができた。これらのことより、老ラットでは、成熟期卵巢摘除の場合とは異なり、 β -EP の生成・放出能はなお存続しているものの視床下部の神経細胞に非可逆的な変化が生じ、エストロゲンの投与に反応しにくくなっていることが示唆された。ただ、神経膠細胞では、卵巢摘除の場合と同様に老ラットにおいても EB 投与により回復することが認められたが、今回のこの成績は Schipper ら³⁸の報告と一致していた。しかし、その詳細な機序については不詳であり、今後の検討が必要と思われる。また、同時に行った視床下部の神経細胞の形態学的観察において、老ラットでは、神経細胞の巨大ミトコンドリアが増加していた。巨大ミトコンドリアの増加は、低酸素状態³⁹、喫煙時⁴⁰などで認められているが、その増加は老化の現象⁴¹ともされている。今回、EB の投与により、巨大ミトコンドリアの減少が見られたが、このような報告はみられず、エストロゲンが老化の予防になんらかの影響を及ぼしていると考えられた。

結 論

視床下部の β -EP について、卵巣摘除および老化に伴う変化と、エストロゲンの投与による影響を検討するために、今回ウイスター系雌ラットを用い検索し、以下の結果を得た。

1. 視床下部の弓状核では、OVX 群、old 群ともに β -EP 陽性細胞はほとんど認められなかった。M 群と比較して、OVX+e 群では、 β -EP 陽性細胞の数および染色性ともにやや回復し、OVX+E 群では、ほぼ回復していた。しかし、old 群では、EB の投与方法に関係なく回復は認められなかった。

2. 正中隆起部の神経核では、OVX 群、old 群ともに β -EP 陽性細胞は減少していた。OVX+e、OVX+E の両群では、M 群と比較して、ほぼ同じ程度に回復していたが、old+e、old+E の両群においては、 β -EP 陽性細胞の回復は認められなかった。

3. 正中隆起部神経線維では、OVX 群において β -EP 陽性神経線維の染色性は低下していたが、old 群では M 群とほぼ同程度であった。OVX+e、OVX+E の両群では、M 群よりも染色性が増加していたが、old+e、old+E の両群においては、M 群との間に差は認めなかった。

4. 正中隆起部の神経細胞線維数については、M 群と比較して、OVX 群、old 群ともに有意に減少していた。OVX+e 群ではやや回復し、OVX+E 群では OVX、OVX+e の両群に比して有意に増加していた。しかし、old 群においては、EB の投与方法に関係なく神経線維数の回復はみられなかった。

5. 神経膠細胞の数には、M 群、OVX 群および old 群の各群間に差は認められなかった。しかし、EB 投与により神経膠細胞数は増加し、特に EB 1 回投与と大量群でより著明であった。

6. 弓状核神経細胞内の巨大ミトコンドリアの割合は、M 群と比較して、OVX 群では変化を認めなかったが、old 群では約 7%と著明に増加した。EB の投与により、old 群では巨大ミトコンドリアの割合は減少したが、特に EB 1 回大量投与の場合により著明であった。

以上のごとく、卵巣摘除および老雌ラットでは、視床下部の β -EP 陽性細胞の減少がみられ、卵巣摘除ラットの場合には、比較的短期間のエストロゲン単独投与により β -EP が回復し、しかも、その投与方法によって β -EP の分布や反応性が異なり、また、神経線維数や神経膠細胞数の増加程度も異なることが確かめられた。一方、老ラットでは、視床下部の神経細胞に非可逆的な変化が生じ、エストロゲンの投与に反応しにくくなっていた。また、同時に行った視床下部の神経細胞の形態学的観察において、エストロゲンが老化の予防になんらかの影響を及ぼしていると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、終始直接御指導下さいました赤祖父一知助教授に深謝致します。なお、本研究の遂行に当たり、貴重な御助言を賜りました生化学第二講座山本 博教授に感謝いたします。また、本研究の遂行にご協力頂きました寺田 督講師はじめ教職員各位、相川みち代文部事務官並びに棚田留美子事務補佐官に深く感謝致します。なお、本論文の要旨は、第62回日本内分泌学会学術総会（東京、1989）、第24回北陸合同内分泌・代謝談話会（金沢、1989）および第38回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会学術講演会（札幌、1990）において発表した。また、本研究の一部は、第1回金沢大学医学部老人医療基金によったもの

であり、ここに付記し謝意を表します。

文 献

- 1) Kupperman, H. S., Mayer, H. S., Blatt, H. G., Wiesbader, H. & Filler, W.: Comparative clinical evaluation of estrogenic preparations by the menopausal and amenorrheal indices. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **13**, 688-703 (1953).
- 2) Genazzani, A. R., Petraglia, F., Facchinetti, F., Facchini, V., Volpe, A. & Alessanarini, G.: Increase of proopiomelanocortin-related peptides during subjective menopausal flushes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **149**, 775-779 (1984).
- 3) Clemens, J. A.: Morphological changes in the hypothalamus and other brain areas influencing endocrine function during aging. *In* J. Meites (ed.), *Neuroendocrinology of Aging*, 1st ed., p.31-39, Plenum Press, New York, 1983.
- 4) Finch, C. E. & Mobbs, C. V.: Hormone influences on hypothalamic sensitivity during aging in female rodents. *In* J. Meites (ed.), *Neuroendocrinology of Aging*, 1st ed., p.143-171, Plenum Press, New York, 1983.
- 5) De Groot, J.: The rat forebrain in stereotactic coordinates. *Trans. R. Neth. Acad. Sci.*, **52**, 1-12 (1959).
- 6) 赤祖父一知, 生水真紀夫, 寺田 督, 西田悦郎: 中高年女性と不定愁訴。産婦人科治療, **58**, 17-20 (1989).
- 7) Erlik, Y., Meldrum, D. R. & Judd, H. L.: Estrogen levels in postmenopausal women with hot flushes. *Obstet. Gynecol.*, **59**, 403-407 (1982).
- 8) Pardridge, W. M. & Mietus, L. J.: Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier: Primary role of albumin-bound hormone. *J. Clin. Invest.*, **64**, 145-154 (1979).
- 9) Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J. & Sonnenschein, C.: Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology*, **103**, 501-512 (1978).
- 10) Casanueva, F., Cochi, D., Locatelli, V., Flauto, C., Zambotti, F., Bestetti, G., Rossi, G. L. & Mueller, E.: Defective central nervous system dopaminergic function in rats with estrogen-induced pituitary tumors, as assessed by plasma prolactin concentrations. *Endocrinology*, **132**, 590-599 (1982).
- 11) Casper, R. F. & Yen, S. S. C.: Neuroendocrinology of menopausal flushes: An hypothesis of flush mechanism. *Clin. Endocrinol.*, **22**, 293-312 (1985).
- 12) 赤祖父一知, 村上弘一, 富松功光, 中川俊信, 生水真紀夫, 三輪正彦, 打出喜義, 原田丈典, 荒木克己: 更年期障害患者の hot flush 発現・非発現時における各種血中ホルモンの動態について。産婦人科治療, **59**, 109 (1989).
- 13) 赤祖父一知: 中高年女性と内分泌変動。産婦人科の世界, **41**, 9-16 (1989).
- 14) Lightman, S. L., Jacobs, H. S., Maguire, A. K., McGarrick, G. & Jeffcoat, S. L.: Climacteric flushing: Clinical and endocrine response to infusion of naloxone. *Br.*

J. Obstet. Gynaecol., 88, 919-924 (1981).

15) Stubbs, W. A., Delitala, G., Jones, A., Jeffcoat, W. J., Edwards, C. R. W., Ratter, S. J., Besser, G. M., Bloom, S. R. & Alberti, K. G. M. M.: Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man. *Lancet*, 2, 1225-1227 (1978).

16) Nishida, E., Akasofu, K., Hashimoto, S., Harada, T., Uchida, K., Nakagawa, T. & Tomimatsu, N.: Any indication for androgen therapy? *In* M. L'Hermite (ed.), *Progress in Reproductive Biology and Medicine*, 1st ed., p.86-94. S. Karger, Basel, 1989.

17) 大森健義, 矢追良正, 斎藤 幹, 一瀬邦弘, 内山 真, 田中邦明, 黒田章史, 赤澤憲治, 高森久純, 濱本 真, 五十嵐博中, 宮崎徳蔵, 萩野信義: アルツハイマー型痴呆に対するエストロゲン療法の可能性について. *産婦人科の世界*, 42, 1087-1095 (1990).

18) Ulrich, A. K., Gurleen, S. S., Felipe, F. C., Victor, H. & Henry, C. F.: Changes in beta-endorphin content in discrete areas of the hypothalamus throughout proestrus and diestrus of the rat. *Life Sci.*, 33, 1443-1450 (1983).

19) Kalra, S. P. & Kalra, P. S.: Opioid-adrenergic-steroid connection in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 38, 418-426 (1984).

20) Sirinathsinghji, D. J. S.: Regulation of lordosis behaviour in the female rat by corticotropin-releasing factor, β -endorphin/corticotropin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the medial preoptic area. *Brain Res.*, 375, 49-56 (1986).

21) Bridges, R. S. & Ronsheim, P. M.: Immunoreactive beta-endorphin concentrations in brain and plasma during pregnancy in rats; possible modulation by progesterone and estradiol. *Neuroendocrinology*, 45, 381-388 (1987).

22) Nohtomi, A., Itoh, M. & Yufu, N.: Effects of sulpiride treatment on the levels of immunoreactive β -endorphin in rat hypothalamic nuclei. *Brain Res.*, 300, 152-156 (1984).

23) Wiesner, J. B., Koenig, J. I., Krulich, L. & Moss, R. L.: Site of action for β -endorphin-induced changes in plasma luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *Life Sci.*, 34, 1463-1473 (1983).

24) Kubo, K., Kiyota, Y. & Fukunaga, S.: Effects of third ventricular injection of β -endorphin on luteinizing hormone surges in female rat: sites and mechanisms of opioid actions in the brain. *Endocrinol. Jpn.*, 30, 419-433 (1983).

25) James, C. W. F., Pia, L. & Peter, P.: Immunocytochemical localization of β -endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 33, 28-42 (1981).

26) Kennedy, B. J., Voller, E., Segaloff, A., Jensen, E. V., DeSombre, E. R., Lemon, H. M., Kelley, R. M., Goldberg, I. R., Rosen, F., Talley, R. W., Ontjes, D. A. & Ney, R. L.: Principles of endocrine therapy. *In* J. F. Holland & E. III. Frei (eds.), *Cancer Medicine*, 2nd ed., p.945-955, Lea & Febiger, Philadelphia, 1982.

27) Aschheim, P.: Aging in the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis in the rat. *In* A. V. Everitt & J. A. Burgess (eds.), *Hypothalamus, Pituitary and Aging*, 1st ed., p.376-418, Thomas, Springfield, 1976.

28) Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N. & Guillemin, R.: Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 1591-1595 (1978).

29) Lamberts, R. & Goldsmith, P. C.: Fixation, fine structure, and immunostaining for neuropeptides: Perfusion versus immersion of the neuroendocrine hypothalamus. *J. Histochem. Cytochem.*, 34, 389-398 (1986).

30) Brawer, J. R., Ruf, K. B. & Naftolin, F.: The effects of estradiol-induced lesions of the arcuate nucleus on gonadotropin release in response to preoptic stimulation in the rat. *Neuroendocrinology*, 30, 144-149 (1980).

31) Brawer, J. R., Schipper, H. & Naftolin, F.: Ovary-dependent degeneration in the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology*, 107, 274-279 (1980).

32) Ronald, P., Hammer, Jr. & Robert, S. B.: Preoptic area opioids and opiate receptors increase during pregnancy and decrease during lactation. *Brain Res.*, 420, 48-56 (1987).

33) Genazzani, A. R., Petraglia, F., Bergamaschi, M., Genazzani, A. D., Facchinetti, F. & Volpe, A.: Progesterone and progestins modulate β -endorphin concentrations in the hypothalamus and in the pituitary of castrated female rats. *Gynecol. Endocrinol.*, 1, 61-69 (1987).

34) Genazzani, A. R., Petraglia, F., Mercuri, N., Brilli, G., Genazzani, A. D., Bergamaschi, M., DeRamundo, B. M. & Volpe, A.: Effect of steroid hormones and antihormones on hypothalamic β -endorphin concentrations in intact and castrated rats. *J. Endocrinol. Invest.*, 13, 91-96 (1990).

35) Genazzani, A. R., Trentini, G. P., Petraglia, F., DeGaetani, C. F., Criscuolo, M., Ficarra, G. & DeRamundo, B. M.: Estrogen modulate the circadian rhythm of hypothalamic β -endorphin contents in female rats. *Neuroendocrinology*, 52, 221-224 (1990).

36) Cotman, C. W. & Scheff, S. W.: Synaptic growth in aged animals. *In* A. Cherken (ed.), *Physiology and Cell Biology of Aging*, 1st ed. p.109-120, Raven Press, New York, 1979.

37) Gambert, S. R., Garthwaite, T. L., Pontzer, C. H. & Hagen, T. C.: Aged-related changes in central nervous system beta-endorphin and ACTH. *Neuroendocrinology*, 31, 252-255 (1980).

38) Schipper, H., Brawer, J. R., Nelson, J. F., Felicio, L. S. & Finch, C. E.: The role of gonads in the histologic aging of the hypothalamic arcuate nucleus. *Biol. Reprod.*, 25, 413-419 (1981).

39) Ne'eman, Z. & Pinson, A.: Oxygen and extracellular fluid restriction in cultured heart cells: electron microscopy studies. *Cardiovasc. Res.*, 24, 555-559 (1990).

40) Regius, O., Rajczy, K., Gergely, I., Borzsonyi, L., Lengyel, E. & Vargha, P.: The effect of smoking on

peripheral blood lymphocytes and some immunological parameters in old age. *Z. Gerontol.*, **23**, 163-167 (1990).
41) Sato, T.: Morphological and biochemical analysis on

autofluorescent granules in various tissues and cells of the rats under several nutritional conditions. *Mech. Ageing Dev.*, **43**, 229-238 (1988).

Morphological Studies on the Hypothalamic β -endorphin in Ovariectomized and Old Female Rats Norimitsu Tomimatsu, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **101**, 827—837 (1992)

Key words β -endorphin, estrogen, oophorectomy, hypothalamus, rat

Abstract

In order to investigate the relationship between β -endorphin and estrogen deficiency in climacterium, histological changes in hypothalamic β -EP were studied in the following 7 groups; 40-day-old rats (M); 54-day-old rats ovariectomized at 40 days of age (OVX); 60-day-old rats ovariectomized at 40 days of age and injected subcutaneously (s. c.) with estradiol benzoate (EB) 0.1 mg/day from 54 days of age for 7 days (OVX+e); 60-day-old rats ovariectomized at 40 days of age and injected s. c. with one dose of EB 1 mg at 54 days of age (OVX+E); 500-day-old (old); 506-day-old rats injected s. c. with EB 0.1 mg/day from 500 days of age for 7 days (old+e); 506-day-old rats injected s. c. with one dose of EB 1 mg at 500 days of age (old+E). Immunocytochemical β -EP staining, light and electron microscopical studies were performed. In the OVX group, β -EP-positive cells were rarely seen in the arcuate nucleus (ARN), and those in the nucleus of the median eminence (ME) were decreased in number as compared with the M group. In addition, β -EP staining of the nerve fibers of the median eminence (me) was decreased as compared with the M group. Therefore, the number of nerve fibers in the median eminence (number of fibers) was significantly reduced ($P<0.05$). Estrogen replacement in the OVX group (OVX+e) almost recovered the number of β -EP-positive cells in the ME and increased the staining of β -EP in the me more than in the M group. The number of glial cells also increased significantly in the OVX+e group ($P<0.05$). The number and staining of β -EP-positive cells recovered completely in the OVX+E group. The nerve fibers were significantly increased in number ($P<0.05$) in the OVX+E group as compared with both the OVX and OVX+e groups, and the increase in the number of glial cells was more significant after the large dose of estrogen ($P<0.05$). In the old group, β -EP-positive cells were rarely seen in the ARN. Estrogen replacement brought about no recovery of β -EP-positive cells in both ARN, ME and (me). No increase of the numbers of fibers was seen. The frequency of giant mitochondria in the neurons in the ARN significantly increased to about 7% ($P<0.05$). The frequency of giant mitochondria in the neurons in the ARN was significantly decreased after estrogen replacement in the old group ($P<0.05$), especially in the old+E group. The results suggested that estrogen protected the neurons of the hypothalamus against the histological changes of aging.